

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 27 AUG 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:** 103 20 312.5**Anmeldetag:** 6. Mai 2003**Anmelder/Inhaber:** Fritz Biochem GmbH i. Ins., 81477 München/DE**Bezeichnung:** Substrat als Träger von Ligaten**IPC:** C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Kahle

Substrat als Träger von Ligaten

5

Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft ein Substrat zum Einsatz als Träger von Ligaten.

10

Stand der Technik

Im Bereich der Biowissenschaften, der Medizintechnik und der Sensorik wurden
speziell in den letzten Jahren viele Sensoren und Verfahren für die
15 Forschungsgebiete „Genomics“ und „Proteomics“ entwickelt. Für das Verständnis
von Organismen ist die Analyse ihrer Gene bzw. ihres Proteinsatzes unerlässlich.
Der Mensch besitzt z.B. in etwa 30000 - 50000 Gene und etwa 500000
verschiedene Proteine. Um diesen enormen Informationsgehalt detektieren zu
können, bedarf es Sensoren mit einem hohen Grad an Parallelisierung und
20 intelligente Auswertealgorithmen. Eine entscheidende Limitierung in Bezug auf die
Qualität eines Sensors stellt der so genannte „dynamic range“ des Sensors dar.

25

Unter dem Begriff „dynamic range“ eines Sensors versteht man den Bereich, in
dem der Sensor auf Änderungen in der Konzentration eines bestimmten Analyten
reproduzierbar und spezifisch reagiert. Der „dynamic range“ eines Sensors beträgt
in der Regel etwa einen Faktor 10 bis 100 in der Analytkonzentration und ist zu
kleinen Konzentrationen hin durch die Sensitivität der Nachweismethode begrenzt.
Für hohe Konzentrationen tritt der Sensor ab einem gewissen Bereich in Sättigung,
so dass eine weitere Erhöhung der Analytkonzentration keine Signaländerung
30 hervorruft.

Im Bereich der Genexpressionsanalyse von Organismen oder der Identifizierung
von Fremdkeimen wie z.B. Viren oder Bakterien in Organismen, wie sie
beispielsweise bei einer medizinischen Untersuchung durchgeführt wird, ergibt sich

oft die Problemstellung, viele verschiedene Analyten nebeneinander quantitativ analysieren zu müssen. Die Konzentrationen dieser Analyten können aber um viele Größenordnungen schwanken. Bereits im nicht-pathogenen Zustand liegen die Analyten in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vor. Die Ausbildung einer pathogenen Wirkung setzt in der Regel erst bei Überschreitung eines Analyt-abhängigen Grenzwertes ein, der ein Vielfaches der tolerablen Grundanalytkonzentration darstellen kann. Solche extrem streuenden Änderungen in den Analytkonzentrationen können von den aus dem Stand der Technik bekannten Sensoren nicht parallel detektiert werden. Vielmehr werden mehrere Sensoren verwendet, die jeweils nur Änderungen der Konzentration einer Gruppe von Analyt-Molekülen detektieren, welche in einer ähnlichen Anfangskonzentration vorliegen.

Darstellung der Erfindung

Hier setzt die Erfindung an. Der Erfindung, wie sie in den Ansprüchen gekennzeichnet ist, liegt die Aufgabe zugrunde, einen Sensor bereitzustellen, der es ermöglicht, die Konzentrationsschwankungen von Bestandteilen einer Analytflüssigkeit parallelisiert zu detektieren, wobei diese Bestandteile in um Größenordnungen verschiedenen Konzentrationen in der Testsubstanz vorliegen können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Substrat nach Anspruch 1 und die Verwendung des Substrats nach Anspruch 24 gelöst. Weitere vorteilhafte Details, Aspekte und Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Figuren und den Beispielen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

ACV	Alternating current voltammetry
dynamic range	Bereich eines Sensors, in dem er auf Änderungen in der Konzentration eines bestimmten Analyten reproduzierbar und spezifisch reagiert.
charakteristischer Belegungsparameter	Parameter der aktiven Bereiche der Sensoroberfläche, wie z.B. die geometrische Fläche der Test-Sites oder ihre Belegungsdichte mit Ligaten. Der charakteristische Belegungsparameter definiert die Anzahl der jeweiligen Ligaten auf der Sensoroberfläche und somit über die Assoziationskonstante auch die Anzahl der Assoziationsereignisse bei gegebener Analytkonzentration.
FcAc	Ferrocen Acetic acid (Ferrocen Essigsäure)
Fluorophor	chemische Verbindung (chemische Substanz), die in der Lage ist, bei Anregung mit Licht ein längerwelliges (rotverschobenes) Fluoreszenzlicht abzugeben. Fluorophore (Fluoreszenzfarbstoffe) können Licht in einem Wellenlängenbereich vom ultravioletten (UV) über den sichtbaren (VIS) bis hin zum infraroten (IR) Bereich absorbieren. Die Absorptions- und Emissionsmaxima sind typischerweise um 15 bis 40 nm gegeneinander verschoben (Stokes-Shift).
Laser-Ablation	Partielles oder vollständiges Entfernen von organischen oder anorganischen Passivierungsschichten, aber auch das Entfernen von Verunreinigungen auf einem Substrat durch Einstrahlung von Laserlicht.
Ligand	Bezeichnung für Moleküle, die vom Ligaten spezifisch gebunden werden; Beispiele von Liganden im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Substrate, Cofaktoren oder Coenzyme eines Proteins (Enzyms), Antikörper (als Ligand

	eines Antigens), Antigene (als Ligand eines Antikörpers), Rezeptoren (als Ligand eines Hormons), Hormone (als Ligand eines Rezeptors) oder Nukleinsäure-Oligomere (als Ligand der komplementären Nukleinsäure-Oligomere).
Ligat	Bezeichnung für (Makro-) Molekül, an dem sich spezifische Erkennungs- und Bindungsstellen für die Ausbildung eines Komplexes mit einem Liganden befinden. Beispiele von Ligaten im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Substrate, Cofaktoren oder Coenzyme eines Proteins (Enzyms), Antikörper (als Ligat eines Antigens), Antigene (als Ligat eines Antikörpers), Rezeptoren (als Ligat eines Hormons), Hormone (als Ligat eines Rezeptors) oder Nukleinsäure-Oligomere (als Ligat der komplementären Nukleinsäure-Oligomere).
μCP	Micro-Contact-Printing.
Osmium-Komplex	[Os(bipy) ₂ Cl imidazolacrylsäure]
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sonde	Auf die Sensoroberfläche aufgebrachte Biomoleküle, die spezifisch ein oder mehrere Moleküle aus der Testsubstanz (Targets) binden können.
Spacer	Beliebige molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül. In der Regel handelt es sich um Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkynyl-Ketten. Bevorzugte Spacer sind solche der Kettenlänge 1 - 20, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung

zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt.

Spot bzw.
Test-Site

Räumlich begrenzte Gebiete auf der Sensoroberfläche, die je einen oder mehrere Typen von Sonden-Moleküle tragen, die spezifisch je ein oder mehrere Moleküle einer Testsubstanz binden können. Die Größe dieser Bereiche bzw. ihre Oberflächenbelegung mit Sonden lässt sich auf die Größenordnung der Target-Konzentration optimieren.

Target

Moleküle in der Testsubstanz, die spezifisch an ein oder mehrere Biomoleküle an der Sensoroberfläche (Sonden) binden können.

(n x HS-Spacer)-
oligo

Nukleinsäure-Oligomer, an das n Thiofunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei die Spacer jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Thiofunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein. Dabei ist „n“ eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.

(n x R-S-S-Spacer)-
oligo

Nukleinsäure-Oligomer, an das n Disulfidfunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei ein beliebiger Rest R die Disulfidfunktion absättigt. Der Spacer zur Anbindung der Disulfidfunktion an das Nukleinsäure-Oligomer kann jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidfunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene

oligo-Spacer-S-S-
Spacer-oligo

natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein. Der Platzhalter „n“ ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.

Zwei gleiche oder verschiedene Nukleinsäure-Oligomere, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind, wobei die Disulfidbrücke über zwei beliebige Spacer an die Nukleinsäure-Oligomere angebunden ist und die beiden Spacer eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidbrücke und dem jeweiligen Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diese durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein.

DNA

Desoxyribonukleinsäure

RNA

Ribonukleinsäure

PNA

Peptidnukleinsäure (synthetische DNA oder RNA, bei der die Zucker-Phosphat-Einheit durch eine Aminosäure ersetzt ist. Bei Ersatz der Zucker-Phosphat-Einheit durch die $-NH-(CH_2)_2-N(COCH_2\text{-Base})-CH_2CO$ -Einheit hybridisiert PNA mit DNA).

A

Adenin

G

Guanin

C

Cytosin

T	Thymin
Base	A, G, T oder C
Bp	Basenpaar
Nukleinsäure	Wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z.B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z.B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z.B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z.B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die sequenzspezifische Bindung natürlich vorkommender cDNA oder RNA.
Nukleinsäure-Oligomer	Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z.B. Nukleinsäure-Oktamer: eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei dem 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent aneinander gebunden sind).
Oligomer	Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.
Oligonukleotid	Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z.B. ein DNA-, PNA- oder RNA-Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.
Oligo	Abkürzung für Oligonukleotid.
ss	single strand (Einzelstrang)

K	Assoziationskonstante
[S]	Tatsächliche Belegungsdichte der Sondenmoleküle an der Oberfläche nach Bindung der Liganden an die Ligaten.
[ST]	Belegungsdichte der Komplexe aus Target und Sondenmolekül an der Oberfläche.
S_0	Gesamtbelegungsdichte der Sondenmoleküle an der Oberfläche.
[T]	Targetkonzentration

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Substrat zum Einsatz als Träger von Ligaten bei einem Verfahren zur Detektion von Ligat-Ligand-Assoziationsereignissen. Auf dem Substrat sind Teststellen angeordnet, die an die Oberfläche gebundene

5 Ligaten aufweisen. Es sind wenigstens zwei Arten von Teststellen vorgesehen, wobei die einzelnen Teststellen mit verschiedenen Arten von Ligaten belegt sind. Durch diese verschiedenen Arten von Ligaten werden jeweils komplementäre Arten von Liganden detektiert, welche in einer Analytlösung in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen vorliegen. Die Teststellen weisen einen charakteristischen

10 Belegungsparameter auf, so dass eine Detektion der Liganden in dem Konzentrationsbereich ermöglicht wird, in dem der jeweilige Ligand in der Analytlösung vorliegt.

Ein Sensor mit einer gegebenen Anzahl von spezifischen Kopplungsstellen erreicht

15 ab einer gewissen Analyt-Konzentration in der Testsubstanz einen Sättigungswert, so dass eine weitere Erhöhung der Konzentration nicht mehr detektiert werden kann. Dies lässt sich theoretisch mit einer Bindungskinetik erster Ordnung für die Bindung einer Sonde S auf der Sensoroberfläche und einem Target T in der Testsubstanz zu einem Oberflächenkomplex ST mit einer Assoziationskonstante K

20 beschreiben:

$$K = [ST] / [S] \cdot [T] \quad (1)$$

Für die Oberflächenbelegungsdichten gilt: $[S] = S_0 - [ST]$, wobei S_0 die Gesamtbelegungsdichte der Sonden und $[S]$ die Belegungsdichte freier Sonden im thermodynamischen Gleichgewicht darstellt. Formt man obige Gleichung um, erhält man einen Ausdruck $[ST] / S_0$ für den relativen Anteil der Oberflächenkomplexe:

$$[ST] / S_0 = K \cdot [T] / (1 + K \cdot [T]) = 1 - [S] / S_0 \quad (2)$$

Dieser Ausdruck als Funktion der auf die Assoziationskonstante K normierten Oberflächenbelegungsdichte S_0 ist in der Figur 1 für vier verschiedene Target-Konzentrationen $[T]$ dargestellt und entspricht den bekannten *Langmuir*-Bindungsisothermen. Im Falle von Bindungsereignissen, die nicht mehr voneinander unabhängig sind und deren Bindungsenergien einer Verteilung unterliegen, ist das *Langmuir*-Modell jedoch nicht mehr gültig. Es entstehen heterogene Adsorptionisothermen, die z.B. durch das *Sips*-Modell beschrieben werden:

$$[ST] / S_0 = (K \cdot [T])^a / (1 + (K \cdot [T])^a) \quad (3)$$

wobei a ein Parameter ($a \leq 1$) ist, der eine Pseudo-Gauß-Verteilung von Bindungsenergien darstellt. Für $a = 1$ geht obige Formel wieder in die *Langmuir*-Isotherme über.

An der Darstellung des *Langmuir*-Modells (Figur 1) ist ersichtlich, dass sich für eine gegebene Analyt-Konzentration der Anteil der Bindungsereignisse ab einer Sondenzahl kleiner einer gewissen Grenze nicht mehr erhöht. In diesem Bereich spricht man von „ambient analyte conditions“ (US 5,807,755). Die Anzahl der Sonden auf dem Sensor führt zu keiner merklichen Verarmung (weniger als 10 %) der Targets in der Testsubstanz. Unter „ambient analyte conditions“ führt eine Erhöhung der Analyt-Konzentration nur zu einer parallelen Verschiebung des Plateaus zu höheren Anteilen von Bindungsereignissen. Nach einer Erhöhung um 2 bis 3 Größenordnungen wird die Sättigung des Sensors erreicht.

Liegt also bei gegebener Assoziationskonstante und Sondenzahl des Sensors eine Analyt-Konzentration vor, die zu einer relativen Belegung (vgl. $[TS]/S_0$ in Figur 1) nahe 1 führt, so sind weitere Konzentrationserhöhungen dieser Spezies in der Testsubstanz nicht mehr zu detektieren. Erhöht man jedoch die Sondenzahl des Sensors für einen in zu hoher Konzentration vorliegenden Target-Typ der Testsubstanz bzw. bringt man diese Sonden bei gleicher Belegungsdichte auf größere Elektroden auf, so lässt sich die relative Belegung dieser Reaktion senken und so die Sensitivität optimieren.

- 10 Durch die vorliegende Erfindung wird ein Sensor mit einem im Hinblick auf die Untersuchung von Analytflüssigkeiten, die Analyten in sehr unterschiedlichen Konzentrationen enthalten, optimierten „dynamic range“ bereitgestellt.

- 15 Der vorliegenden Erfindung liegt die Idee zu Grunde, dass durch Optimierung des „dynamic range“ eines Sensors Änderungen in den Konzentrationen von Bestandteilen einer flüssigen Testsubstanz auch dann parallel detektiert werden können, wenn die Ausgangskonzentrationen dieser Bestandteile um viele Größenordnungen streuen.

- 20 Bevorzugt kommt das Substrat der Erfindung als Träger von Biomolekülen bei einem Verfahren zur elektrochemischen bzw. fluoreszenzspektroskopischen Detektion von Bestandteilen einer Elektrolytlösung zum Einsatz. Das erfindungsgemäße Substrat kann auch in einem elektrochemischen bzw. fluoreszenzspektroskopischen Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen verwendet werden.

- 25 Die vorliegende Erfindung beschreibt einen Sensor mit räumlich begrenzten Gebieten verschiedener Sonden-Moleküle (Spots), die spezifisch je ein oder mehrere Target-Moleküle aus einer Testsubstanz binden können. Die Spots der Erfindung sind in Größe und/oder Oberflächenbelegung der Sonden (charakteristische Belegungsparameter des Substrats) so auf die zu detektierenden Konzentrationsbereiche der entsprechenden Targets optimiert, dass der Anteil an Bindungsereignissen aller Spots für z.B. den nicht-pathogenen Zustand unabhängig von der eigentlichen Konzentration ihrer Targets in etwa gleich ist. Dadurch lässt

sich der spezifische „dynamic range“ eines Sensors auf diesen „Anfangszustand“ normieren. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der angeglichenen Sensitivität aller Spots hinsichtlich der zu detektierenden Konzentrationsänderungen der entsprechenden Targets unabhängig von deren Anfangskonzentration. Der Sensor ist somit auf den „tolerierbaren“ Konzentrationsbereich zwischen dem „erlaubten“, nicht-pathogenen Wert und dem „kritischen“, pathogenen Wert jedes Analyten optimiert.

Für die Optimierung des Sensors sollten also die „erlaubten“, nicht-pathogenen Konzentrationen der Analyten der Testflüssigkeiten zu Beginn einer Experimentserie bekannt sein. Speziell im Bereich der Genexpressionsanalyse oder der Identifikation von Keimen ist die Zusammensetzung des Analyt-Pools eines gesunden Organismus in der Regel hinreichend bekannt, so dass mit dem vorliegenden Verfahren anhand der Änderungen von einzelnen Analyten Indizien für eine Erkrankung (Überschreitung des „kritischen“ Konzentrationswertes eines Analyten) geliefert werden können.

Für das quantitative Auslesen der verschiedenen Spots des Sensors in Bezug auf mögliche Bindungsereignisse kommen im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle geeigneten Messmethoden in Abhängigkeit von den verwendeten Substraten und den jeweiligen Biomolekülen in Frage.

Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substrate werden bevorzugt verschiedene Arten von Liganden detektiert, die in der Analyt-Lösung in Konzentrationsbereichen vorliegen, deren Mittelwerte sich um wenigstens einen Faktor 10 unterscheiden. Unter dem Mittelwert c_m eines Konzentrationsbereichs wird der Wert $c_m = ((c_{\max} - c_{\min}) / 2) + c_{\min}$ verstanden, wobei c_{\max} die maximale Konzentration und c_{\min} die minimale Konzentration bedeutet. Bevorzugt können verschiedene Arten von Liganden detektiert werden, wobei sich die Mittelwerte der Konzentrationsbereiche, in denen sie in der Analyt-Lösung vorliegen, um wenigstens einen Faktor 100, insbesondere bevorzugt um wenigstens einen Faktor 1000, ganz besonders bevorzugt um wenigstens einen Faktor 10000 unterscheiden.

Die vorliegende Erfindung umfasst auch die Verwendung der Substrate in Verfahren zur Detektion von Ligat-Ligand-Assoziationsereignissen.

Die Substrate können insbesondere in fluoreszenzspektroskopischen und elektrochemischen Nachweisverfahren verwendet werden. Als elektrochemische Nachweisverfahren kommen Chronoamperometrie (CA), Chronocoulometrie (CC), Linear Sweep Voltammetrie (LSV), zyklische Voltammetrie (CSV), Alternating current voltammetry (ACV), Voltammetrietechniken mit verschiedenen Pulsformen, insbesondere Square Wave Voltammetrie (SWV), Differential Pulse Voltammetrie (DPV) oder Normal Pulse Voltammetrie (NPV), AC Impedanzspektroskopie, Chronopotentiometrie und zyklische Chronopotentiometrie in Frage.

Sensor-Substrate mit aktiven Flächen verschiedener Größen

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem charakteristischen Belegungsparameter des Substrats um die Größe der Fläche der einzelnen Teststellen. Bevorzugt unterscheidet sich die Fläche der Teststellen um mindestens den Faktor 10, besonders bevorzugt um mindestens den Faktor 100, insbesondere bevorzugt um mindestens den Faktor 1000 und ganz besonders bevorzugt um mindestens den Faktor 10000.

Bevorzugt werden Substrate, die Teststellen-Flächen zwischen $1 \mu\text{m}^2$ und 1mm^2 aufweisen. Besonders bevorzugt werden Substrate, die Teststellen-Flächen zwischen $10 \mu\text{m}^2$ und $100000 \mu\text{m}^2$ aufweisen.

Als Sensor-Substrate eignen sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle Festkörper mit frei zugänglicher Oberfläche, die mit Biomolekülen funktionalisiert und mit einer flüssigen Testsubstanz benetzt werden können. Als Festkörpersubstrate kommen sowohl Kunststoffe als auch Metalle, Halbleiter, Gläser, Verbundstoffe oder poröse Materialien in Frage. Die Bezeichnung Oberfläche ist unabhängig von den räumlichen Dimensionen der Oberfläche.

Die Oberfläche des Sensors muss in räumlich getrennte Bereiche unterteilbar sein. Dies lässt sich durch Strukturierung des Festkörpersubstrats in aktive und inaktive Bereiche oder durch partielle Funktionalisierung seiner homogenen Oberfläche realisieren.

5

Die Strukturierung der Festkörpersubstrate in aktive und inaktive Bereiche lässt sich z.B. durch Lithographie, Vakuumabscheidung, elektrochemische Abscheidung, Dotieren oder Laserbehandlung erreichen. Auf homogenen Substraten kann man die Strukturierung durch Aufbringen und Strukturierung von Passivierungsschichten realisieren. Erfindungsgemäß eignet sich als Passivierungsschicht jedes beliebige Material, das an einer Oberfläche eine geschlossene Schicht bildet und somit die Substratoberfläche von der Umgebung trennt. Zu einem späteren Zeitpunkt kann das Material z.B. durch Laser-Ablation an den gewünschten Stellen in seiner gesamten Dicke rückstandsfrei entfernt werden.

10

15

Auch ohne Strukturierung der Substrate können räumlich getrennte Bereiche unterschiedlicher Funktionalisierung hergestellt werden. Hier sei exemplarisch auf das Mikrokontakt-Drucken μ CP (micro-contact-printing), das erstmals von Whitesides 1994 (A. Kumar, G.M. Whitesides, Science, 1994, 263, 60) vorgestellt wurde, hingewiesen. Bei diesem Verfahren wird ein mikrostrukturierter Stempel mit einer Flüssigkeit benetzt, anschließend in direktem Kontakt mit dem zu bearbeitenden Substrat gebracht und so der Oberfläche eine laterale chemische Struktur aufgeprägt.

20

25

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden elektrisch leitfähige Materialien wie Platin, Palladium, Gold, Cadmium, Quecksilber, Nickel, Zink, Kohlenstoff, Silber, Kupfer, Eisen, Blei, Aluminium, Mangan, beliebige dotierte oder nicht-dotierte Halbleiter und binäre oder ternäre Verbindungen als Oberflächen der Sensorsubstrate verwendet. Zur Realisierung von räumlich getrennten aktiven Test-Sites bzw. Spots auf dem Sensor können homogene elektrisch leitfähige Oberflächen strukturiert werden oder aber leitfähige Materialien auf räumlich getrennte Bereiche eines nicht-leitfähigen Substrats, wie z.B. Glas oder Kunststoff in beliebiger Dicke aufgebracht werden.

30

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden als Sensorsubstrate isolierende Trägerplatten verwendet, die zweckmäßig einseitig starre Trägerplatten, doppelseitig starre Trägerplatten oder starre Mehrlagenträgerplatten sind. Alternativ kann die isolierende Trägerplatte eine einseitige oder doppelseitige flexible Trägerplatte, insbesondere aus einer Polyimidfolie oder eine starr-flexible Trägerplatte sein. Sie besteht mit Vorteil aus einem Basismaterial, das ausgewählt ist aus der Gruppe BT (Bismaleinimid-Triazinharz mit Quarzglas), CE (Cyanatester mit Quarzglas), CEM1 (Hartpapierkern mit FR4-Außenlagen), CEM3 (Glasvlieskern mit FR4-Außenlagen), FR2 (Phenolharzpapier), FR3 (Hartpapier), FR4 (Epoxid-Glashartgewebe), FR5 (Epoxid-Glashartgewebe mit vernetztem Harzsystem), PD (Polyimidharz mit Aramidverstärkung), PTFE (Polytetrafluorethylen mit Glas oder Keramik), CHn (hochvernetzte Kohlenwasserstoffe mit Keramik) und Glas.

Diese Trägerplatten weisen eine gewisse Anzahl von Leiterbahnen mit einer Goldoberfläche auf, die mit einer Lötstopplackschicht als Passivierung überzogen sind. An einem Ende der Leiterbahnen befinden sich Kontakte für elektrochemische Untersuchungen, am anderen Ende werden mit einer Laser-Ablation freie Goldstellen für die spätere Funktionalisierung in den Lack gebrannt. Mit Hilfe der Laser-Ablation lassen sich Spots beliebiger Größe und Geometrie in den Lack schreiben, wobei nur die Breite der Leiterbahnen eine Grenze darstellt. Die Laser-Ablation entfernt erfindungsgemäß nicht nur die Lackschicht an gewünschten Stellen, sondern sorgt durch das kurzzeitige Aufschmelzen der Goldoberfläche auch für die Reduktion der Oberflächenrauigkeit und das Verschließen von Poren. Durch das Aufschmelzen der Substrate werden zusätzlich wenige Goldlagen von der Oberfläche ablatiert und somit Verunreinigungen entfernt.

Die gerade beschriebenen Leiterbahn-Substrate eignen sich sowohl für elektrochemische Messmethoden als auch für die Fluoreszenz-Spektroskopie.

Funktionalisierung der aktiven Flächen mit Ligaten

Die aktiven Bereiche des Sensors sind mit Ligaten funktionalisiert, die als Sonden für die in der Testsubstanz vorhandenen Liganden fungieren. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung eignen sich alle Arten von Ligaten, um Analytflüssigkeiten auf das Vorhandensein ihrer spezifischen Liganden zu untersuchen. Als Ligaten werden Moleküle bezeichnet, die spezifisch mit einem Liganden unter Ausbildung eines Komplexes wechselwirken. Beispiele von Ligaten im Sinne der vorliegenden Schrift sind Substrate, Cofaktoren oder Coenzyme als Komplexbindungspartner eines Proteins (Enzyms), Antikörper (als Komplexbindungspartner eines Antigens), Antigene (als Komplexbindungspartner eines Antikörpers), Rezeptoren (als Komplexbindungspartner eines Hormons), Hormone (als Komplexbindungspartner eines Rezeptors), Nukleinsäure-Oligomere (als Komplexbindungspartner des komplementären Nukleinsäure-Oligomers) oder Metallkomplexe.

Für die Kopplung der Biomoleküle mit der Sensoroberfläche stehen aus dem Stand der Technik eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung. Beispiele hierfür sind: (i) Thiol- (HS-) oder Disulfid- (S-S-) Gruppen, die an Oberfläche aus Au, Ag, Cd, Hg und Cu koppeln, (ii) Amine, die sich durch Chemi- oder Physisorption an Platin-, Silizium- oder Kohlenstoff-Oberflächen anlagern, (iii) Silane, die mit oxidischen Oberflächen eine kovalente Bindung eingehen und (iv) Epoxy-Zement, der an alle leitfähigen Oberflächen bindet (Heller et al., Sensors and Actuators, 1993, 180, 13-14; Pishko et al., Anal. Chem., 1991, 63, 2268; Gregg and Heller, J. Phys. Chem., 1991, 95, 5970-5975).

Zur Immobilisierung der Sonden werden Methoden bevorzugt, bei der die Anzahl der Sonden auf der Sensoroberfläche linear mit der Fläche skaliert, also z.B. das Aufbringen von Sonden-Monolagen unter Bedingungen, die eine Belegung kleiner der dichtesten Packung ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind aber auch „Volumenverfahren“ zur Immobilisierung der Sonden z.B. über funktionalisierte Polymere denkbar, solange die Sondenanzahl weiter mit der Fläche skaliert.

Bevorzugt werden die freien Substratstellen mit modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren in wässriger Lösung benetzt. Das Nukleinsäure-Oligomer, das auf die freie Oberfläche aufgebracht werden soll, ist über einen kovalent angebundenen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge mit einer oder mehreren reaktiven Gruppen modifiziert, wobei sich diese reaktiven Gruppen bevorzugt in der Nähe eines Endes des Nukleinsäure-Oligomers befinden. Bei den reaktiven Gruppen handelt es sich bevorzugt um Gruppen, die direkt mit der unmodifizierten Oberfläche reagieren können. Beispiele hierfür sind: (i) Thiol- (HS-) oder Disulfid- (S-S-) derivatisierte Nukleinsäure-Oligomere der allgemeinen Formel $(n \times \text{HS-Spacer})\text{-oligo}$, $(n \times \text{R-S-S-Spacer})\text{-oligo}$ oder $\text{oligo-Spacer-S-S-Spacer-oligo}$, die mit einer Goldoberfläche unter Ausbildung von Gold-Schwefelbindungen reagieren, (ii) Nukleinsäure-Oligomere mit Aminen, die sich durch Chemi- oder Physisorption an Platin- oder Silizium-Oberflächen anlagern und (iii) Nukleinsäure-Oligomere mit Silanen, die mit oxidischen Oberflächen eine kovalente Bindung eingehen. Bei diesen Arten der Anbindung von Nukleinsäure-Oligomeren werden in der Regel Belegungen kleiner der dichtesten Packung realisiert, so dass für eine spätere Hybridisierung ausreichend Platz auf der Oberfläche zur Verfügung steht.

Am anderen Ende des Nukleinsäure-Oligomers kann das Molekül bei Bedarf über einen weiteren Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge zusätzlich mit einem elektrochemischen Label modifiziert werden, wenn die Funktionalisierung der freien Substratstellen und die spätere Hybridisierung mit Hilfe elektrochemischer Methoden untersucht werden sollen. Auch ohne die Modifikation der Sonden-Oligonukleotide mit einem Redox-Label können elektrochemische Methoden zur Untersuchung der Hybridisierungsereignisse verwendet werden, wenn alternativ die Targetmoleküle mit einem Redox-Label versehen sind. Eine weitere elektrochemische Detektionsvariante stellt ein Verdrängungsassay dar, bei dem an die ungelabelten Sonden-Oligomere gebundene, kurzkettige Signal-Oligomere mit Redox-Label von ungelabelten Target-Oligomeren der Komplementärsequenz verdrängt werden.

Als Redox-Label der Ligaten oder Liganden können Übergangsmetallkomplexe, insbesondere solche des Kupfers, Eisens, Rutheniums, Osmiums oder Titans mit Liganden wie Pyridin, 4,7-Dimethylphenanthrolin, 9,10-Phenanthrenchinondiimin,

Porphyrine und substituierte Porphyrin-Derivate verwendet werden. Daneben ist der Einsatz von Riboflavin, von Chinonen wie Pyrrolochinolinochinon, Ubichinon, Anthrachinon, Naphtochinon oder Menachinon bzw. Derivaten davon, von Metallocenen und Metallocenderivaten wie Ferrocenen und Ferrocenderivaten, Cobaltocenen und Cobaltocenderivaten, von Porphyrinen, Methylenblau, Daunomycin, Dopamin-Derivaten, Hydrochinon-Derivaten (para- oder ortho-dihydroxy-Benzol-Derivaten, para- oder ortho-dihydroxy-Anthrachinon-Derivaten, para- oder ortho-dihydroxy-Naphtochinon-Derivaten) und ähnlichen Verbindungen möglich.

10

Alternativ zum Redox-Label können Ligaten oder Liganden als zweite Funktionalisierung über einen weiteren Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge ein Fluorophor erhalten, wenn die Funktionalisierung der freien Substratstellen und die spätere Hybridisierung mit Hilfe von optischen Methoden untersucht werden sollen. Analog zur elektrochemischen Analyse kann die Fluoreszenz-Spektroskopie auch mit einem Fluorophor an den Target-Molekülen und ungelabelten Sonden durchgeführt werden.

15

Als Fluorophore können hierfür kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. Texas Red®, Rhodamin-Farbstoffe, Cy3™, Cy5™, Fluorescein etc. (vgl. Fluka, Amersham und Molecular Probes Katalog) verwendet werden.

20

Für die Funktionalisierung der freigelegten Substratstellen eignen sich vor allem zwei Techniken. Beim Spotting-Verfahren werden mit einem kommerziell erhältlichen Spotter kleine Volumina gezielt auf die Spots des Substrats aufgebracht, wobei jeder Spot mit verschiedenen Molekülen funktionalisiert werden kann. Alternativ können alle freigelegten Spots mit den gleichen Sonden-Molekülen funktionalisiert werden, indem das Substrat z.B. in die Sonden-Flüssigkeit getaucht wird oder aber das gesamte Substrat benetzt wird.

25

30

Variation der Oberflächenkonzentration der Ligaten

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die Anzahl der Sonden auf der Sensoroberfläche auch ohne die Variation der aktiven Spotgröße eingestellt werden. Somit können verschiedene Mengen an Sonden-Molekülen auch mit nur
5 einem Sensor-Design auf Spots gleicher Größe realisiert werden.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellen also Substrate dar, deren charakteristischer Belegungsparameter die
10 Belegungsdichte der Teststellen mit Ligaten ist.

Besonders bevorzugt unterscheiden sich die Belegungsdichten der Teststellen mit Ligaten um mindestens den Faktor 10, insbesondere bevorzugt um mindestens den Faktor 100 und ganz besonders bevorzugt um mindestens den Faktor 1000.
15

Für die Kontrolle der Oberflächenbelegung eignen sich verschiedene Varianten. Die Belegung kann z.B. über die Inkubationszeit, die Anzahl an Kopplungsgruppen pro Molekül, die Molarität des Belegungspuffers oder über die Konzentration der Moleküle in der Inkubationslösung eingestellt werden.
20

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Oberflächenbelegung über ein Koadsorbant eingestellt. Hierzu wird entweder ein geeignetes Koadsorbant in einer bestimmten Konzentration zur Inkubationslösung der Sonden-Moleküle zugegeben und mit der Sensoroberfläche in Kontakt gebracht oder aber das Koadsorbant wird in einem zweiten Belegungsschritt nach der Funktionalisierung mit den Sonden aufgebracht. Das Koadsorbant weist bevorzugt dieselbe Kopplungsgruppe auf wie das Sonden-Molekül, belegt somit einen Teil der aktiven Oberfläche und sorgt für eine reduzierte Oberflächenbelegung der Sonde. Die Oberflächenbelegung lässt sich über die Konzentration des Koadsorbats in der
25
30 jeweiligen Inkubationslösung einstellen.

Für die weiter oben beschriebenen Nukleinsäure-Oligomere mit Thiol-Kopplungsgruppe eignen sich besonders bevorzugt kurzkettige Thiole der allgemeinen Struktur $\text{SH}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$, wobei X eine beliebige Kopfgruppe sein kann.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll nachfolgend anhand der Ausführungsbeispiele im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen

5

Fig. 1 Theoretische Kurven des relativen Anteils an Bindungsereignissen ($[TS]/S_0$) für verschiedene Target-Konzentrationen. Die Konzentration der Sonden an der Sensoroberfläche ist auf die Assoziationskonstante der Bindung normiert.

Fig. 2 Schematisches Bild eines Ausschnitts der auf Leiterplatten-Technologie basierenden Sensor-Substrate. a) Aufsicht auf das Leiterbahnen-Substrat mit freien Substratstellen verschiedener aktiver Fläche und Geometrie. b) Querschnitt durch ein Substrat mit 3 gleichen Elektrodenspots.

Fig. 3 a) Schematisches Bild eines Hybridisierungs-Experiments mit 2 Redox-Labeln. b) ACV-Kurven ($U_{ac} = 10 \text{ mV}$, $f = 5 \text{ Hz}$) eines typischen Experiments auf einer Arbeitselektrode mit $d = 10 \text{ }\mu\text{m}$ vor und nach der Hybridisierung. Der linke Peak bei etwa $U = 220 \text{ mV}$ zeigt das Osmium der Sonde, der rechte Peak bei etwa $U = 360 \text{ mV}$ zeigt das Ferrocen des Targets. Die Potentiale sind gegen eine Ag/AgCl Referenz-Elektrode angegeben.

Wege zur Ausführung der Erfindung

10

Eine exemplarische Prozessführung zur Analyse einer Testflüssigkeit mit Nukleinsäure-Oligomeren mit Hilfe eines auf der Leiterplatten-Technologie basierenden Sensors ist in den folgenden Beispielen geschildert.

15 Die durch Laser-Ablation freigelegten Goldstellen des Substrats werden mit doppelt modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert, die an dem einen Ende eine Thiol-Gruppe zur Bindung an die Goldoberfläche und an dem anderen Ende ein

elektrochemisches Label (z.B. Osmium-Komplexe) besitzen. Die gewünschte Anzahl an Sonden auf der Sensoroberfläche wird entweder über die Elektrodengröße oder durch Verwendung eines kurzkettigen Thiols bestimmter Konzentration als Koadsorbant eingestellt. Die Nukleinsäure-Oligomere der Testflüssigkeit besitzen ebenfalls ein elektrochemisches Label (z.B. Ferrocenderivate), so dass sowohl die Belegung mit den Nukleinsäure-Oligomeren als auch die Hybridisierungs-Effizienz mit elektrochemischen Methoden bestimmt werden können.

10 Eine bevorzugte Messmethode zur Analyse der Belegung und der Hybridisierungs-Effizienz ist die AC (alternating current) Voltammetrie. Aus dem ACV-Strom am Redox-Potential des Labels lässt sich nach O'Connor et al. (J. Electroanal. Chem., 466, 1999, 197-202) die Anzahl der beteiligten Label berechnen. Die Experimente sind somit quantitativ auswertbar.

15

Die in den folgenden Beispielen geschilderten Verfahren sind für den Fachmann ohne weiteres auf die Beschichtung anderer Sensoroberflächen mit anderen Biomolekülen und auf andere Detektionsmethoden übertragbar.

20

Beispiel 1: Leiterplatten-Substrate.

25 Auf einer Trägerplatte aus Epoxid-Glashartgewebe FR4 wird ein Leiterbild aus fünfzig parallelen Leiterbahnen aufgebracht. Figur 2a zeigt einen Ausschnitt dieses Leiterbahnenbildes. Der Ausschnitt zeigt 4 der 48 Arbeitselektroden (20A bis 20D) und einen Teil der Gegenelektrode 28.

30

Das gesamte Leiterbild ist mit einer 15 µm bis 20 µm dicken Passivierungsschicht 22 (Fig. 2b) aus strukturierbaren, optisch aushärtbaren Lack (2-Komponenten Lötstopplack, Elpemer GL 2467 SM-DG, Fa. Peters) überzogen. In die Passivierungsschicht werden durch hochenergetische Pulse eines Excimer-Lasers Ausnehmungen 24, 24A bis 24D in den Lack eingebracht, die zur Aufnahme der Biomoleküle 26 dienen. Bei einer Passivierungsschicht mit 15 µm bis 20 µm Dicke benötigt man zum Entfernen des Lacks und zum kurzfristigen Aufschmelzen der

Oberfläche etwa 130 Pulse á 20 ns eines Excimer-Lasers (Lambda Physics) mit einer Flächenleistung von 600 - 1200 mJ/cm². Das Aufschmelzen der Oberfläche führt zum Verschluss von Oberflächenporen der Goldschicht, zu einer Reduktion der Oberflächenrauigkeit und durch Ablation weniger Goldlagen zum Entfernen von Oberflächenverunreinigungen. Die Laser-Bestrahlung des Substrats kann direkt oder über eine Optik bzw. Maske erfolgen und ermöglicht Ausnehmungen beliebiger Größe und Geometrie.

Figur 2b zeigt einen Schnitt durch ein Leiterbahnsubstrat mit 3 gleichen Spots. Jede der Leiterbahnen 20 besteht aus einem Kupferkern 14, der durchgehend von einer Nickel-Sperrschicht 16 und einer Goldschicht 18 überzogen ist. Im Ausführungsbeispiel hat der Kupferkern eine Dicke von etwa 28 µm. Er stellt einen preiswerten und gut leitfähigen Grundbestandteil der Leiterbahnen dar. Um sehr genaue Messungen bei der elektrochemischen Detektion im wässrigen Medium zu ermöglichen, ist der unedle Kupferkern mit einer 6 µm dicken, durchgehenden Nickelschicht als Diffusionssperre überzogen. Auf dieser Nickel-Schicht wird eine 2 µm dicke Goldschicht aufgebracht.

Die Leiterbahnen des Ausführungsbeispiels sind etwa 150 µm breit und mit einem Abstand von etwa 200 µm (Mitte-Mitte) auf der Trägerplatte angeordnet. Die Arbeitselektroden, die Gegenelektrode und eine gegebenenfalls vorgesehene Referenzelektrode sind zur Kontaktierung jeweils mit nicht dargestellten Anschlusskontaktflächen des elektrischen Substrats verbunden.

In den Ausführungsbeispielen haben die Leiterbahnen kreisrunde Ausnehmungen mit Durchmessern von 10 µm, 30 µm, 100 µm und rechteckige Ausnehmungen der Dimension 100 µm x 700 µm (vgl. 24A bis 24D in Figur 2a). Diese Ausnehmungen weisen also Flächen von 78,5 µm², 706,5 µm², 7850 µm² bzw. 70000 µm² auf, so dass die aktive Fläche der Elektroden um etwa einen Faktor 1000 variiert wird.

Beispiel 2: Funktionalisierung der Spots des Substrats mit Nukleinsäure-Oligomeren.

Die im Beispiel 1 beschriebenen freien Substratstellen verschiedener Größe werden
5 z.B. über ein Spotting-Verfahren mit den Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert.

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt in einem automatischen Oligonukleotid-
Synthesizer (Expedite 8909; ABI 384 DNA/RNA-Synthesizer) gemäß der vom
Hersteller empfohlenen Syntheseprotokolle für eine 1.0 µmol Synthese. Bei den
10 Synthesen mit dem 1-O-Dimethoxytrityl-propyl-disulfid-CPG-Träger (Glen Research
20-2933) werden die Oxidationsschritte mit einer 0.02 mol/l Iodlösung durchgeführt,
um eine oxidative Spaltung der Disulfidbrücke zu vermeiden. Modifikationen an der
5'-Position der Oligonukleotide erfolgen mit einem auf 5 min verlängerten
Kopplungsschritt. Der Amino-Modifizierer C2 dT (Glen Research 10-1037) wird in die
15 Sequenzen nach dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut. Die
Kopplungseffizienzen werden während der Synthese online über die DMT-Kationen-
Konzentration photometrisch bzw. konduktometrisch bestimmt.

Die Oligonukleotide werden mit konzentriertem Ammoniak (30%) bei 37°C 16 h
20 entschützt. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgt mittels RP-HPL
Chromatographie nach Standardprotokollen (Laufmittel: 0.1 mol/l
Triethylammoniumacetat-Puffer, Acetonitril), die Charakterisierung mittels MALDI-
TOF MS. Die aminmodifizierten Oligonukleotide werden an die aktivierten Redox-
Label (z.B. Osmium-Komplexe) entsprechend den dem Fachmann bekannten
25 Bedingungen gekoppelt. Die Kopplung kann sowohl vor als auch nach der
Anbindung der Oligonukleotide an die Oberfläche erfolgen.

Die Substrate aus dem Beispiel 1 werden z.B. mit doppelt modifiziertem 20 bp
Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3'
30 (Modifikation eins: die Phosphatgruppe des 3' Endes ist mit (HO-(CH₂)₂-S)₂ zum P-
O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH verestert. Modifikation zwei: an das amino-modifizierte 5'
Ende ist der Osmium-Komplex [Os(bipy)₂ Cl imidazolacrylsäure] nach dem
jeweiligen Standardprotokoll eingebaut) als 5x10⁻⁵ molare Lösung in Puffer

(Phosphatpuffer, 0.5 molar in Wasser, pH 7 mit 0.05 vol% SDS) mit Hilfe eines Spotters (Carthesian) aufgebracht und für 2 - 24 h inkubiert.

Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer $\text{P-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-S-S-(CH}_2\text{)}_2\text{-OH}$ des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1:1 Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Statt des Einzelstrang-Oligonukleotids kann der Einzelstrang auch mit seinem Komplementärstrang hybridisiert sein.

Für die Belegung mit dem Spotter der Firma Cartesian Technologies (MicroSys PA) werden Split-Pin Nadeln (ArrayIt Chipmarker Pins der Firma TeleChem) verwendet, die ein Ladevolumen von 0.2 bis 0.6 μl haben und Volumina von etwa 1 nl pro Benetzungsvorgang abgeben. Die Kontaktfläche dieser Nadeln hat einen Durchmesser von etwa 130 μm und ist damit deutlich größer als die bei der Laser-Ablation freigelegten Bereiche des Substrates. Die Positionierung der Nadel über dem Substrat erfolgt mit einer Genauigkeit von 10 μm bei einer Luftfeuchtigkeit von etwa 70 - 80%. Der Tropfen wird beim Kontakt der Spitze mit der Passivierungsschicht abgegeben und es kommt zu keiner direkten Berührung mit dem Substrat („Pseudo-Kontakt-Drucken“).

Beispiel 3: Variation der Oberflächenbelegung durch Koadsorbate.

Die Belegungsdichte eines Spots mit Nukleinsäure-Oligomeren lässt sich durch die Koadsorption mit Thiolen kontrolliert reduzieren, um somit den relativen Anteil von Bindungsereignissen bei gleich bleibender Target-Konzentration und Elektrodengröße zu erhöhen.

Für die Koadsorption von Thiolen stehen zwei Verfahren zur Wahl. In einem Verfahren besteht die Inkubationslösung aus den Nukleinsäure-Oligomeren (analog Beispiel 2) mit zusätzlich zwischen ca. 10^{-5} bis 10^{-1} molarem Propanthiol. Dieses gleichzeitig anwesende, freie Propanthiol wird durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert und beansprucht somit Platz auf der Sensoroberfläche. Bei einem

alternativen Verfahren wird das Propanthiol (10^{-5} bis 10^{-1} molar in 500 mmol/l Phosphat-Puffer) in einem zweiten Inkubationsschritt (30 min bis 12 h) nach der Funktionalisierung der Sensoroberfläche mit Nukleinsäure-Oligomeren aufgebracht.

- 5 Durch die Verwendung von Propanthiol als Koadsorbent kann die Oberflächenbelegungsdichte der Nukleinsäure-Oligomere in beiden Varianten um bis zu einem Faktor 10 reduziert werden.

10 **Beispiel 4: Variation der Oberflächenbelegung durch Belegungsparameter.**

Auch durch die Variation ausgewählter Belegungsparameter bei der Funktionalisierung mit Nukleinsäure-Oligomeren lässt sich die Oberflächenbelegungsdichte der Spots des Sensors einstellen.

15

Erhöht man z.B. die Konzentration der Nukleinsäure-Oligomere in der Inkubationslösung (500 mmol/l Puffer) von 1 $\mu\text{mol/l}$ auf 30 $\mu\text{mol/l}$, so steigt die Belegungsdichte um einen Faktor 5. Eine ähnliche Erhöhung der Oberflächenbelegung erhält man, wenn die Konzentration des Inkubationspuffers von 10 mmol/l auf 500 mmol/l bei einer Sonden-Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ erhöht wird.

20

Beispiel 5: Hybridisierung mit komplementären Nukleinsäure-Oligomeren.

25

Ein Substrat mit 48 Arbeitselektroden wird wie in Beispiel 1 beschrieben mit aktiven Bereichen verschiedener Größen hergestellt. In Gruppen von je 12 Elektroden werden mit dem Excimer-Laser kreisrunde Löcher mit einem Durchmesser von 10 μm (Spotgruppe 1), 30 μm (Spotgruppe 2) bzw. 100 μm (Spotgruppe 3) und ein rechteckiges Profil mit 100 μm x 700 μm (Spotgruppe 4) gebrannt. Die einzelnen Spotgruppen weisen also Flächen von 78,5 μm^2 , 706,5 μm^2 , 7850 μm^2 bzw. 70000 μm^2 auf, so dass die Fläche um einen Faktor von rund 1000 variiert wird.

30

Die Arbeitselektroden einer Spotgruppe werden jeweils mit doppelt modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren (Sonden) einer bestimmten Sequenz (S1 bis S4) analog dem Beispiel 2 funktionalisiert. Die Arbeitselektroden weisen annähernd die gleichen Oberflächenbelegungsdichten auf. Figur 3 zeigt exemplarisch eine ACV-Messung ($U_{ac} = 10 \text{ mV}$, $f = 5 \text{ Hz}$) einer Arbeitselektrode (Symbole \square in Figur 3), die mit Osmium-modifizierten Oligomeren funktionalisiert ist. Aus dem Redox-Strom am Potential des Osmium-Komplexes lässt sich die Oberflächenbelegungsdichte mit Nukleinsäure-Oligomeren berechnen. Im vorliegenden Fall ergibt sich ein Wert von $5 \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$.

Nach der Funktionalisierung werden die Arbeitselektroden noch vor der Hybridisierung mit komplementären, Ferrocen-modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren in einem Nachbelegungsschritt für 30 Minuten mit einer 1 mmol/l Lösung Propanthiol in Kontakt gebracht. Hierbei werden die Räume zwischen den Nukleinsäure-Oligomeren hydrophobisiert. Dadurch verschiebt sich das Redox-Potential des Ferrocens zu positiveren Werten, wodurch eine bessere Separation vom Osmium-Potential erreicht wird.

Die vier unterschiedlichen Target-Nukleinsäure-Oligomere werden analog Beispiel 2 aber ohne Thiol-Modifikation am 3' Ende synthetisiert. Die Target-Nukleinsäure-Oligomere weisen eine zu jeweils einem Sonden-Nukleinsäure-Oligomer komplementäre Sequenz (T1 bis T4) auf. Für die Modifikation mit dem Redox-Label Ferrocen werden die amino-modifizierten Nukleinsäure-Oligomere am 5' Ende mit Ferrocennessigsäure (FcAc) gemäß dem jeweiligen Standardprotokoll gekoppelt.

Die 4 verschiedenen Ferrocen-modifizierten Nukleinsäure-Oligomere werden der Target-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen ($T1 = 0.1 \text{ } \mu\text{mol/l}$, $T2 = 1 \text{ } \mu\text{mol/l}$, $T3 = 10 \text{ } \mu\text{mol/l}$, $T4 = 100 \text{ } \mu\text{mol/l}$ in 500 mmol/l Phosphat-Puffer, pH 7, mit 1 mol/l NaCl und 0.05 vol% SDS) zugegeben und auf alle Spots des Sensors aufgebracht. Nach einer gewissen Inkubationszeit unter hybridisierenden Bedingungen wird das Substrat gespült und erneut eine elektrochemische ACV-Messung ($U_{ac} = 10 \text{ mV}$, $f = 5 \text{ Hz}$) durchgeführt (Symbole \blacksquare in Figur 3). Die Messdaten zeigen einen zweiten Redox-Peak, wobei das Verhältnis der Peak-Ströme des Osmium-Labels und des Ferrocen-Labels der Hybridisierungs-Effizienz des Experiments entspricht.

Die Messdaten der Hybridisierung aus Figur 3 zeigen eine Elektrode nahe der Sättigung mit einer Hybridisierungseffizienz von über 90 %. Die Arbeitselektroden mit den auf die Konzentrationen der jeweiligen Targets angepassten Größen zeigen
 5 hingegen alle die gleichen Hybridisierungs-Effizienzen von etwa 30 - 40 %.

Beispiel 6: Diagnostik-Chip.

10 In der medizinischen Diagnostik ist es wünschenswert, mehrere diagnostisch relevante Parameter gleichzeitig bei einer Untersuchung zu erfassen. Ein wichtiges Beispiel aus dem Bereich der Routineuntersuchungen ist ein Vaginalabstrich, der unter anderem auf HPV, E-Coli und Laktobazillen untersucht wird. Bei einem solchen Abstrich wird mit Hilfe von standardisierten Tupfern eine Probe
 15 entnommen, die dann mit genormten Verfahren behandelt wird, um die RNA der vorhandenen Bakterien und die doppelsträngige DNA der Viren zu erhalten. Bei einer Untersuchung werden Keim- bzw. Partikelzahlen bis zu einer gewissen Grenze als unbedenklich eingestuft: Bei HPV sind dies 100 Partikel, bei E-coli 100 Keime und bei Laktobazillen 10000 Keime aller relevanten Laktobazillen. Da in
 20 Bakterienzellen die charakteristischen RNAs jeweils etwa 10^4 -fach vorkommen, muss ein parallelisierter Chip-Test sehr unterschiedliche Konzentrationen erfassen können, um alle Parameter gleichzeitig bei einer Untersuchung zu erhalten. Ein erfindungsgemäßer Sensor-Chip für obige Anwendung hat drei verschiedene Spotgrößen, die mit für die jeweiligen Krankheits-Targets spezifischen Sonden-Polynukleotiden funktionalisiert sind. Zum Nachweis der HPV-DNA im Bereich von
 25 10^2 bis 10^4 Molekülen in der Testsubstanz werden Spots mit einer Fläche von $1 \mu\text{m}^2$ verwendet, während für die E-Coli-RNA im Bereich von 10^6 bis 10^8 Molekülen (entsprechend 10^2 bis 10^4 Keimen) Flächen von $10^4 \mu\text{m}^2$ und für die Laktobazillen-RNA im Bereich von 10^8 bis 10^{10} Molekülen (entsprechend 10^4 bis 10^6 Keimen)
 30 Flächen von $10^6 \mu\text{m}^2$ benutzt werden. Durch die Wahl der Elektrodengrößen wird gewährleistet, dass der Sensor für den jeweiligen Bereich ab den kritischen Target-Konzentrationen der verschiedenen Erreger quantitative Messungen zulässt und somit eine parallele Diagnose aller Krankheiten getroffen werden kann.

Patentansprüche

1. Substrat zum Einsatz als Träger von Ligaten bei einem Verfahren zur Detektion von Ligat-Ligand-Assoziationsereignissen, mit auf dem Substrat angeordneten Teststellen (24) und mit an die Oberfläche der Teststellen (24) gebundenen Ligaten (26), wobei wenigstens zwei Arten von Teststellen (24) vorgesehen sind, wobei die verschiedenen Arten von Teststellen jeweils mit verschiedenen Arten von Ligaten (26) belegt sind, wobei durch die verschiedenen Arten von Ligaten (26) jeweils komplementäre Arten von Liganden detektiert werden, wobei die Liganden in einer Analytlösung in jeweils unterschiedlichen Konzentrationsbereichen vorliegen, und wobei die Teststellen (24) einen charakteristischen Belegungsparameter aufweisen, der eine Detektion der Liganden in deren jeweiligen Konzentrationsbereich erlaubt.
2. Substrat nach Anspruch 1, wobei der charakteristische Belegungsparameter die Fläche der Teststellen ist.
3. Substrat nach Anspruch 2, wobei sich die Fläche der Teststellen (24) um mindestens den Faktor 10 unterscheidet.
4. Substrat nach Anspruch 2, wobei sich die Fläche der Teststellen (24) um mindestens den Faktor 100 unterscheidet.
5. Substrat nach Anspruch 2, wobei sich die Fläche der Teststellen (24) um mindestens den Faktor 1000 unterscheidet.
6. Substrat nach Anspruch 2, wobei sich die Fläche der Teststellen (24) um mindestens den Faktor 10000 unterscheidet.
7. Substrat nach einem der Ansprüche 2 bis 6, wobei die Fläche der Teststellen (24) zwischen $1 \mu\text{m}^2$ und 10mm^2 beträgt.

8. Substrat nach Anspruch 7, wobei die Fläche der Teststellen (24) zwischen $10 \mu\text{m}^2$ und $100000 \mu\text{m}^2$ beträgt.
- 5 9. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der charakteristische Belegungsparameter die Belegungsdichte der Teststellen mit Ligaten ist.
- 10 10. Substrat nach Anspruch 9, wobei sich die Belegungsdichte der Teststellen (24) mit Ligaten um mindestens den Faktor 10 unterscheidet.
- 15 11. Substrat nach Anspruch 9, wobei sich die Belegungsdichte der Teststellen (24) mit Ligaten um mindestens den Faktor 100 unterscheidet.
- 15 12. Substrat nach Anspruch 9, wobei sich die Belegungsdichte der Teststellen (24) mit Ligaten um mindestens den Faktor 500 unterscheidet.
- 20 13. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei sich die jeweiligen Mittelwerte der Konzentrationsbereiche, in denen die verschiedenen Arten von Liganden vorliegen, um wenigstens einen Faktor 10 unterscheiden.
- 25 14. Substrat nach Anspruch 13, wobei sich die jeweiligen Mittelwerte der Konzentrationsbereiche, in denen die verschiedenen Arten von Liganden vorliegen, um wenigstens einen Faktor 100 unterscheiden.
- 25 15. Substrat nach Anspruch 13, wobei sich die jeweiligen Mittelwerte der Konzentrationsbereiche, in denen die verschiedenen Arten von Liganden vorliegen, um wenigstens einen Faktor 1000 unterscheiden.
- 30 16. Substrat nach Anspruch 13, wobei sich die jeweiligen Mittelwerte der Konzentrationsbereiche, in denen die verschiedenen Arten von Liganden vorliegen, um wenigstens einen Faktor 10000 unterscheiden.

17. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als Liganden Cofaktoren oder Coenzyme und als Ligaten Proteine oder Enzyme verwendet werden.
- 5 18. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei als Liganden Antikörper und als Ligaten Antigene verwendet werden.
19. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei als Liganden Antigene und als Ligaten Antikörper verwendet werden.
- 10 20. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei als Liganden Rezeptoren und als Ligaten Hormone verwendet werden.
- 15 21. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei als Liganden Hormone und als Ligaten Rezeptoren verwendet werden.
22. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei als Liganden Nukleinsäure-Oligomere und als Ligaten dazu komplementäre Nukleinsäure-Oligomere verwendet werden.
- 20 23. Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Substrat mit einer Passivierungsschicht belegt ist, die an den Teststellen (24) Aussparungen aufweist.
- 25 24. Verwendung eines Substrats nach einem der vorhergehenden Ansprüche in einem Verfahren zur Detektion von Ligat-Ligand-Assoziationsereignissen.
- 30 25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei es sich um ein elektrochemisches Nachweisverfahren handelt ausgewählt aus der Gruppe Chronoamperometrie (CA), Chronocoulometrie (CC), Linear Sweep Voltammetrie (LSV), zyklische Voltammetrie (CSV), Alternating current voltammetry (ACV), Voltammetrietechniken mit verschiedenen Pulsformen, insbesondere Square Wave Voltammetrie (SWV), Differential Pulse Voltammetrie (DPV) oder Normal

Pulse Voltammetrie (NPV), AC oder DC Impedanzspektroskopie, Chronopotentiometrie und zyklische Chronopotentiometrie.

26. Verwendung nach Anspruch 24, wobei es sich um ein
5 fluoreszenzspektroskopisches Nachweisverfahren handelt.

Zusammenfassung

Beschrieben wird ein Substrat zum Einsatz als Träger von Ligaten bei einem
5 Verfahren zur Detektion von Ligat-Ligand-Assoziationsereignissen, mit auf dem
Substrat angeordneten Teststellen 24 und mit an die Oberfläche der Teststellen 24
gebundenen Ligaten 26, wobei wenigstens zwei Arten von Teststellen 24
vorgesehen sind, wobei die verschiedenen Arten von Teststellen jeweils mit
10 verschiedenen Arten von Ligaten 26 belegt sind, wobei durch die verschiedenen
Arten von Ligaten 26 jeweils komplementäre Arten von Liganden detektiert werden,
wobei die Liganden in einer Analytlösung in jeweils unterschiedlichen
Konzentrationsbereichen vorliegen, und wobei die Teststellen 24 einen
charakteristischen Belegungsparameter aufweisen, der eine Detektion der Liganden
15 in deren jeweiligen Konzentrationsbereich erlaubt.

Fig. 2b

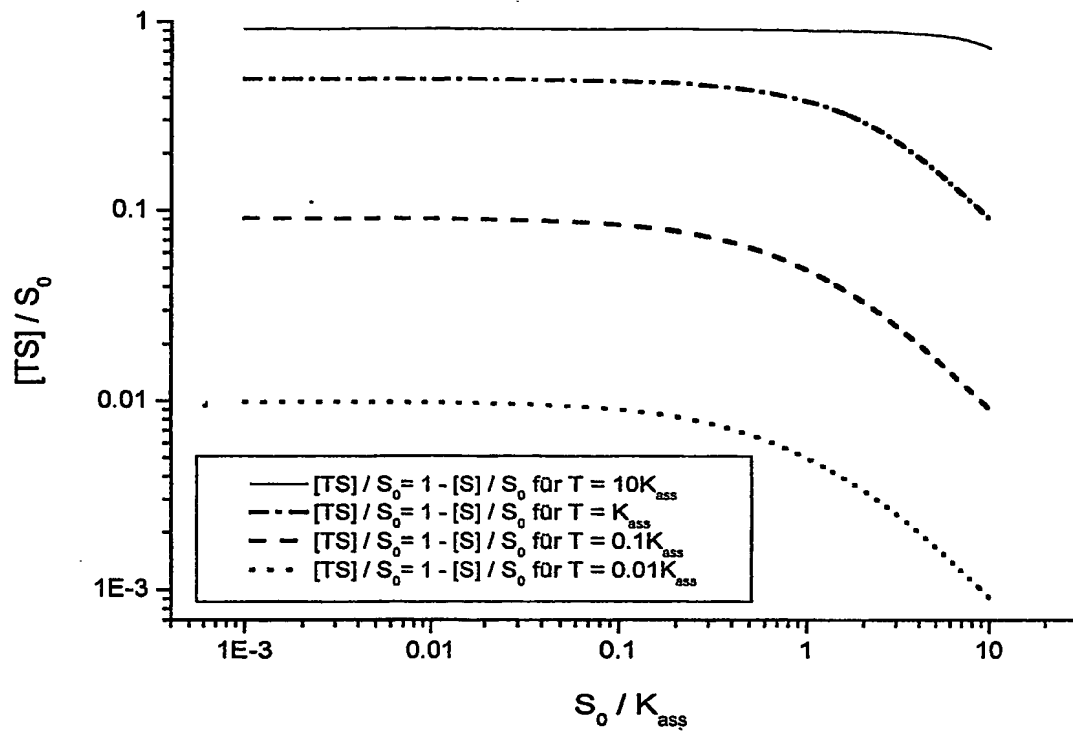


Fig. 1

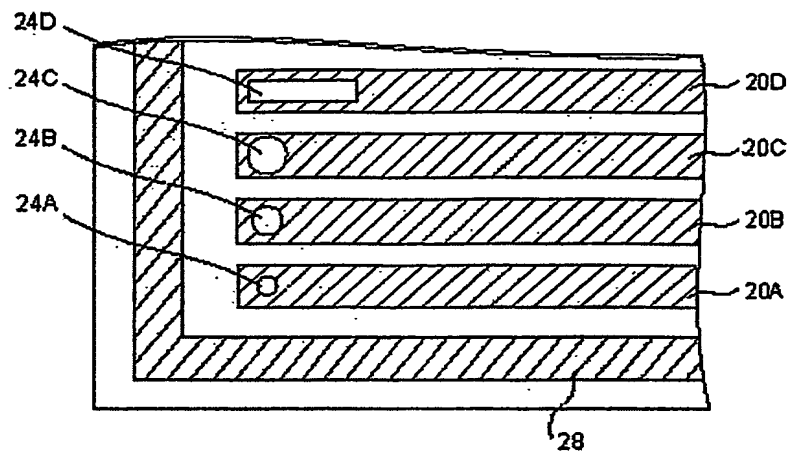


Fig. 2a

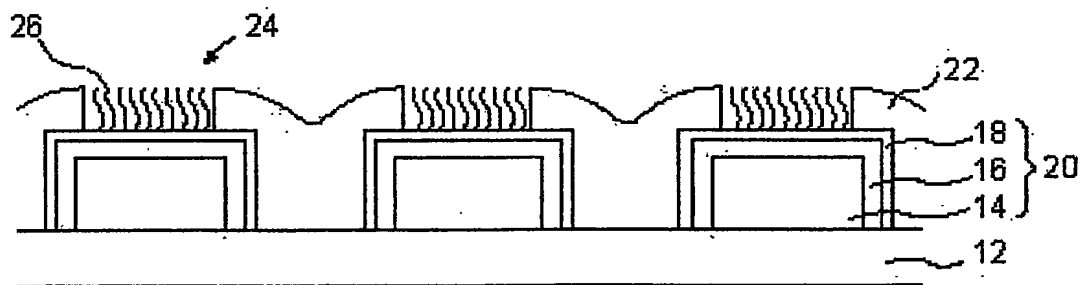


Fig. 2b

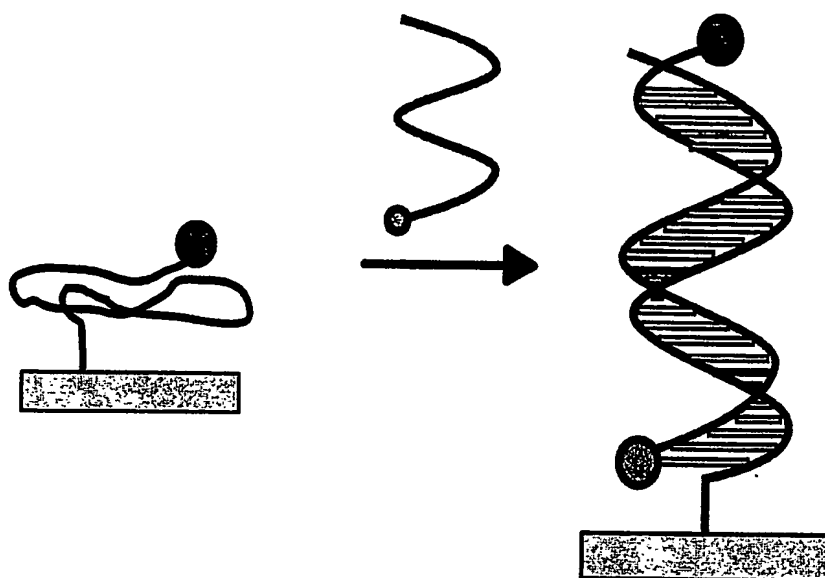


Fig. 3a

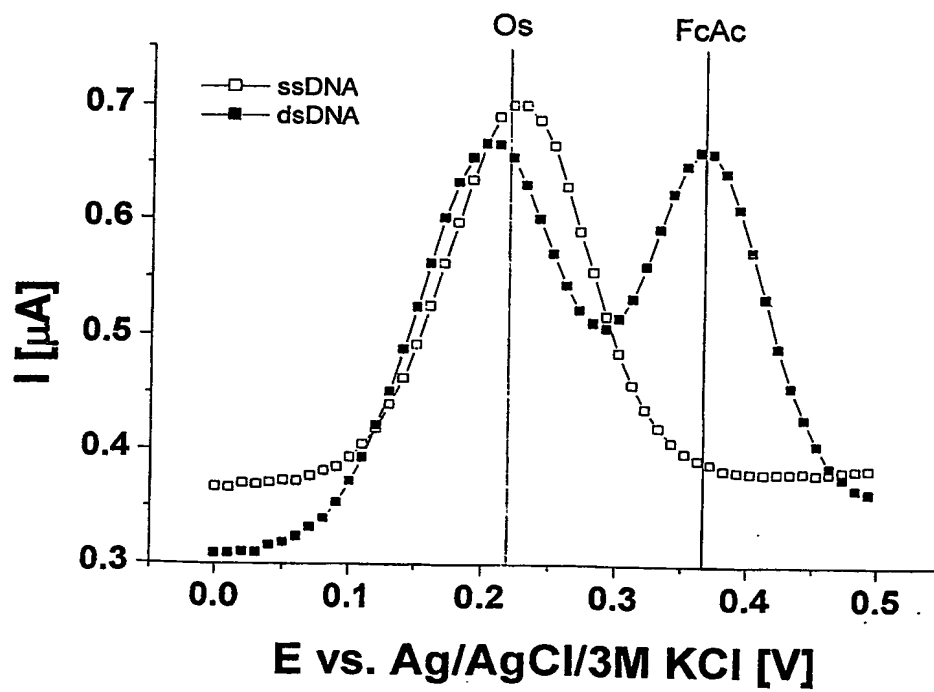


Fig. 3b